Crop Biotech.
Summer (2015) 10: 41-56.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره دهم، تابستان ۱۳۹۴ (۵۶-۴۱)

بررسی حضور جایگاه‌های ژنی مقاومت به بیماری زنگ زرد و زنگ سیاه (ساقه) در لاین‌های دابل‌هاپلویید گندم نان با استفاده از نشانگرهای مولکولی

فرشاد بختیار[۱]، عزت‌الله فرشادفر[۲]، مصطفی آقایی‌سربرزه[۳]، حبیب‌الله قزوینی[۴]، فرزاد افشاری[۵]

۱. دانشجوی دوره دکتری پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه
۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه
۳. استاد بخش تحقیقات غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
٤. دانشیار بخش تحقیقات غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۵. استاد بخش تحقیقات غلات، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۳/۲۰- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/٦/۲۹)

Study on the presence of yellow and stem rust resistance genes in doubled haploid lines of bread wheat using molecular markers

Farshad Bakhtiar[1], Ezatolah Farshadfar[2], Mostafa Aghaee Sarbarzeh[3], Habibolah Ghazvini[4], Farzad Afshari[5]

1. Ph.D. Student, Department of Crop Production and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran.
2. Professor, Department of Crop Production and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran.
3. Professor, Cereal Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.
4. Associate Professor, Cereal Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.
5. Professor, Cereal Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.
(Received: Jun. 7, 2015 - Accepted: Sep. 20, 2015)

Abstract

In this research, 150 wheat doubled haploid lines were produced using chromosome elimination method by crossing between wheat and maize. Resistance of doubled haploid lines, their parents and check cultivars against strip and stem rust was evaluated at seedling and adult plant stages. Accordingly, eight known molecular markers which are tightly linked to resistance genes including *Yr*5, *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26, *Yr*15, *Sr*38/*Yr*17/*Lr*37, *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38, *Yr*27, *Yr*36 and *Yr*48 were screened in parents. Results showed that molecular markers for *Yr*5, *Yr*15, *Yr*27 and *Yr*36 couldn't detect polymorphism between parents as well as positive and negative controls. For gene block *Sr*38/*Yr*17/*Lr*37 and locus *Yr*48 allele sizes were not similar to those which were expected for these genes. Results also showed that MV17 and Flanders have gene block of *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26, and only 3 lines of population DH-26: Ghods*3/MV17 had this gene block from which two doubled haploid lines showed resistance reaction to TTSTK and TTKSK of *Puccinia graminis pers*. f.sp *tritici* races. Genetic test for the presence or absence of gene block *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 on parents of doubled haploid lines showed that MV17 comprises this gene block. Evaluation of doubled haploid lines for this gene block showed that 6 doubled haploid lines of population DH-26:Ghods*3/MV17 have gene block *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 for which only one doubled haploid line showed resistance reaction to *Puccinia striiformis* Westend f.sp. *tritici* race of 7E158A^{+}, *Yr*27 at both seedling and adult plant stages.

Keywords: Wheat, Rust Diseases, Molecular marker, Doubled Haploid.

چکیده

در این تحقیق با استفاده از روش حذف کروموزومی تلاقی گندم و ذرت ۱۵۰ لاین دابل‌هاپلویید گندم تولید شد. لاین‌های تولید شده به همراه والدین و ارقام شاهد در دو مرحله گیاهچه و گیاه کامل نسبت به بیماری‌های زنگ زرد و زنگ سیاه گندم ارزیابی شدند و هشت جایگاه ژنی مقاومت به بیماری شامل Yr5، Sr31/Yr9/Lr26، Yr15، Sr38/Yr17/Lr37، Lr34/Yr18/Pm38، Yr27، Yr36 و Yr48 در والدین جمعیت‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که نشانگرهای مورد استفاده برای مکان‌های ژنی Yr5، Yr15،Yr27 و Yr36 قادر به تشخیص پلی‌مورفیسم بین والدها، شاهد حساس بولانی و کنترل‌های مثبت نبودند. در مکان‌های ژنی Sr38/Yr17/Lr37 و Yr48 عدم تکثیر باندهای موردنظر بیان‌کننده عدم حضور آلل موثر این جایگاه‌های ژنی در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید بود. در این تحقیق بلوک ژنی Sr31/Yr9/Lr26 در ارقام MV17 و فلاندرز مشاهده شد. بررسی لاین‌های دابل‌هاپلویید نسبت به این بلوک ژنی نشان داد که تنها سه لاین از جمعیت DH-26:Ghods*3/MV17 دارای بلوک‌ژنی Sr31/Yr9/Lr26 بودند که دو لاین از آنها نسبت به نژادهای زنگ سیاه TTSTK و TTKSK واکنش مقاومت نشان دادند. آزمون ژنتیکی حضور و یا عدم حضور آلل موثر بلوک ژنی Lr34/Yr18/Pm38 بر روی والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید بیان کننده حضور آلل موثر این بلوک ژنی در والد MV17 بود. بررسی لاین‌های دابل‌هاپلویید نسبت به این بلوک ژنی نشان داد که شش لاین دابل‌هاپلویید از جمعیت DH-26:Ghods*3/MV17 حاوی بلوک ژنی Lr34/Yr18/Pm38 بودند که تنها یک لاین از آنها نسبت به نژاد زنگ زرد 7E158A^{+},Yr27 دارای واکنش مقاومت در مراحل گیاهچه و گیاه کامل بود.

واژه‌های کلیدی: گندم، بیماری زنگ، نشانگر مولکولی، دابل‌هاپلویید.

E-mail:

* نویسنده مسئول:

مقدمه

یکی از عوامل محدودکننده عملکرد در واحد سطح، تنش‌های زنده محیطی از جمله بیماری‌ها هستند. در بررسی عوامل بیماری‌زای گندم، زنگ‌ها بیشترین خسارت را در طول تاریخ به این محصول وارد کرده‌اند. قارچ‌های عامل زنگ‌های گندم متعلق به جنس *Puccinia*، خانواده *Pucciniaceae*، راسته *Uredinales*، رده *Uredinomycets* و شاخه *Basidiomycota* می‌باشند (Alexopoulos and Mims, 1997). سه زنگ مهم گندم عبارتند از زنگ زرد (زنگ نواری) *Puccinia striiformis* Westend; زنگ سیاه (زنگ ساقه) *Puccinia graminis pers.* f.sp *tritici* و زنگ قهوه‌ای (زنگ برگ) *Puccinia triticina* f.sp. *tritici*. از خصوصیات مهم زنگ‌ها می‌توان به وجود نژادهای فیزیولوژیک متعدد، قدرت تولید نژادها و بیوتیپ‌های جدید، قدرت تکثیر و تولید مثل سریع و همه‌گیر شدن آنها اشاره کرد. زنگ‌های غلات تقریباً در تمام نقاط دنیا وجود دارند و در هر منطقه‌ای که میزبان حساس کشت شود و شرایط محیطی مناسب باشد، باعث بروز خسارت می‌شوند. میزان خسارت‌های حاصل از سه بیماری زنگ سیاه، زنگ قهوه‌ای و زنگ زرد در نقاط مختلف دنیا نشان دهنده متفاوت بودن مناطق بروز همه‌گیری این بیماری‌ها در سطح جهان است (Saari and Prescott, 1985). به طور کلی زنگ زرد در مناطق غرب آسیا، آفریقای جنوبی، چین، جنوب آمریکا و اروپای شمالی اهمیت بیشتری دارد. زنگ قهوه‌ای موجب بروز خسارت‌های بسیار مهمی در جنوب و جنوب شرقی آسیا، شمال آفریقا، و جنوب آمریکا می‌شود و زنگ سیاه در شمال آمریکا، استرالیا، شمال و جنوب آفریقا و مناطق وسیعی از اروپا مهم است (McIntosh *et al*., 1995). در سال‌های ۱۹۱۸ تا ۱۹۷۶ بروز همه‌گیری بیماری‌های زنگ سیاه و زنگ قهوه‌ای موجب کاهش بیش از ۵۰٪ محصول در سراسر ایالت‌های آمریکا شد. اگرچه زنگ نواری (زرد) گسترش بسیار محدودی داشت اما در مزارع تجاری کاهش میزان محصول تا بیش از۷۰٪ گزارش شد (Roelfs, 1978). در همه‌گیری سال‌های ۱۹۹۳ و ۱۹۹۵ در ایران، ارقام مقاومی مانند فلات، قدس و نوید که عملکرد و سطح زیر کشت بالاتری داشتند، مقاومت خود را از دست دادند. میزان خسارت بیماری زنگ زرد در سال ۱۹۹۴ حدود ۱/۵ میلیون تن برآورد شد که در برگیرنده بیش از ۱۵٪ پتانسیل کل تولید گندم کشور بود (Torabi *et al*., 1995). بیش از سه دهه مزارع گندم دنیا به واسطه حضور ژن مقاومت *Sr*31 در برابر بیماری زنگ سیاه مقاوم بودند تا اینکه با ظهور نژاد جدید بیماری (UG99) در سال ۱۹۹۸ در اوگاندا و پس از آن در سال ۲۰۰۱ در کنیا مقاومت این ژن شکسته شد (Singh *et al.,* 2004). اگرچه از میزان خسارت ناشی از بیماری زنگ سیاه در طی سال‌های اخیر گزارش قابل توجهی در کشور ارائه نشده است، با این وجود تحقیقات گسترده‌ای به منظور پیشگیری از وقوع همه‌گیری احتمالی این بیماری در حال اجرا می‌باشد.

مکانیسم اصلی کنترل زنگ‌های غلات استفاده از ارقام مقاوم است، این روش هزینه اضافی بر کشاورزان تحمیل نمی‌کند و استفاده از مواد شیمیایی و عملیات زراعی را محدود می‌نماید (Johnson, 1981). همچنین با توجه به اینکه ارقام گیاهان خودگشن از نظر ژنتیکی هموزیگوت می‌باشند، می‌توان از یک جمعیت دابل‌هاپلویید جهت انتخاب و معرفی ارقام با صفات زراعی مورد نظر استفاده کرد (Snape, 1989). در روش‌های کلاسیک اصلاحی (پدیگری و بالک) حدود شش نسل خودگشن جهت دستیابی به حد نصاب کافی هموزایگوسیتی بعد از تلاقی اولیه زمان لازم است. هر نسل خود گشنی باعث کاهش هتروزایگوسیتی و افزایش هموزایگوسیتی می‌شود. بدیهی است که با در نظر گرفتن کلیه ژن‌ها حتی بعد از تعداد زیادی نسل خودگشن هموزایگوسیتی کامل بدست نمی‌آید.

مهمترین مزیت سیستم دابل‌هاپلوییدی دستیابی به هموزایگوسیتی مطلق در حداقل زمان ممکن و افزایش کارایی انتخاب است. افزایش کارایی انتخاب بیشتر به روش به‌نژادی و نوع رقم بستگی دارد. کارایی انتخاب موجب شناسایی بهتر، بین ژنوتیپ‌ها در مدت یک نسل آزمایش مزرعه‌ای و پاسخ بهتر به انتخاب می‌شود (Bakhtiar *et al*., 2006). در تحقیقات غلات از نشانگرهای مولکولی به عنوان وسیله‌ای برای شناسایی ژن‌های اصلی، QTLها و یا معرفی مشخصات جدید در ژرم‌پلاسم‌های پیشرفته استفاده می‌شود. برای مثال در گندم برخی از نشانگرهای مولکولی شناسایی شده، با بیش از چهل صفت مهم زیستی وابسته‌اند (Gupta *et al.,*1999a). دانستن جایگاه این ژن‌ها/آلل‌های مخصوص، امکان انتخاب به کمک نشانگر را در غلات آسان می‌کند. در تحقیقات انجام شده توسط Basnet *et al.* (2015) با استفاده از نشانگرهای SSR و SNP مشخص شد که لاین پیش‌رفته ND643/2*Weebill1 دارای ژن مقاومت به بیماری زنگ سیاه نژاد Ug99 با نام SrND643 می‌باشد. این ژن دارای مقاومت در هر دو مرحله گیاهچه و گیاه کامل است. انتخاب به کمک نشانگر به محقق اجازه می‌دهد که در طی نسل اول و در مراحل اولیه رشد و نمو گیاه عمل انتخاب را انجام دهد. با استفاده از تکنیک انتخاب به کمک نشانگر آلل‌های نامناسب در طی مراحل اولیه توسعه گیاه حذف و یا کاهش یافته، این امر موجب تمرکز انتخاب در مزرعه به همراه کاهش تعداد گیاهان بالغ می‌شود. این تحقیق با هدف استفاده از روش هاپلوییدی بمنظور دستیابی به هموزایگوسیتی کامل در حداقل زمان ممکن و بکارگیری نشانگرهای مولکولی شناخته شده برای شناسایی مکان‌های ژنی مقاومت به بیماری‌های زنگ زرد و سیاه گندم، در سه جمعیت ژنتیکی دابل‌هاپلویید حاصل از تلاقی رقم قدس با ارقام مقاوم MV17، فلاندرز و هیبرید برسی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق برای تولید لاین‌های دابل‌هاپلویید گندم از روش حذف کروموروومی تلاقی گندم و ذرت (Bakhtiar *et al*., 2006) استفاده شد. در مجموع ۱۵۰ لاین دابل‌هاپلویید شامل، ۷۵ لاین با شجره DH-26: Ghods*3/MV17، ۴۵ لاین با شجره DH-27: Flanders/3*Ghods و ۳۰ لاین با شجره DH-28:Hybride Bersee/*3Ghods تولید شد. واکنش لاین‌های دابل‌هاپلویید به همراه والدین و ارقام شاهد پارسی (مقاوم به زنگ زرد و زنگ سیاه)، میهن (مقاوم به زنگ زرد و نیمه‌حساس تا نیمه‌مقاوم نسبت به زنگ سیاه)، بولانی (حساس به زنگ زرد) و مکنیر (حساس به زنگ سیاه)، در دو مرحله گیاهچه و گیاه کامل مورد ارزیابی قرار گرفت. ارزیابی مقاومت به بیماری زنگ زرد در مرحله گیاه کامل با نژاد 7E158A^{+},*Yr*27 در مزرعه بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و ارزیابی مقاومت مرحله گیاهچه با دو نژاد کرج 7E158A^{+},*Yr*27 و کرمانشاه 110E158A^{+},*Yr*27 در شرایط گلخانه انجام شد. ارزیابی مقاومت به بیماری زنگ سیاه ساقه گندم در مرحله گیاه کامل با نژاد TTSTK در مزرعه ایستگاه تحقیقاتی کلاردشت و ارزیابی مقاومت مرحله گیاهچه با دو نژاد کلاردشت TTSTK و دشت آزادگان خوزستان TTKSK در شرایط گلخانه واحد بیماری‌های بخش غلات صورت گرفت. ارزیابی‌های فوق در قالب طرح آزمایشی آگمنت و با استفاده از روش‌های روئلفز (Roelfs *et al.,* 1992)، مکنیل (McNeal *et al*., 1971) و پیترسون (Peterson *et al*., 1948) انجام شد. سپس هشت جایگاه ژنی Yr5، Sr31/Yr9/Lr26، Yr15، Sr38/Yr17/Lr37، Lr34/Yr18/Pm38، Yr27، Yr36 و Yr48 مرتبط با مقاومت به بیماری زنگ گندم در لاین‌های تولید شده مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تشخیص حضور این جایگاه‌های ژنی در لاین‌های دابل‌هاپلویید، ابتدا حضور و یا عدم

حضور ژن مورد نظر در والدین لاین‌ها و کنترل‌های مربوط به هرکدام از مکان‌های ژنی مورد بررسی قرار گرفت و در صورت مثبت بودن نتیجه آزمایش، لاین‌های دابل‌هاپلویید نسبت به آن مکان ژنی ارزیابی شدند.

برای این منظور بذر ارقام و لاین‌های مورد بررسی در گلدان‌های پلاستیکی کشت شد و در مرحله سه برگی با استفاده از روش CTAB استخراج DNA از برگ‌های جوان انجام شد (Saghai-maroof *et al*., 1984). وضعیت DNA استخراج شده از نظر خصوصیات کمی و کیفی شامل غلظت، شکستگی و وجود یا عدم وجود RNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر برای هر واکنش با استفاده از PCR Buffer (1X)، آغازگرهای موردنظر برای هر ژن یا بلوک ژنی (۲۰۰ nM)، آنزیم تک‌پلیمراز (۱ unit)، dNTPs به میزان ۰/۲ mM، $MgCL_2$ به میزان mM ۲و DNA به میزان ng ۴۰ برای هر واکنش انجام شد. برنامه حرارتی PCR به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله اتصال با توجه به دمای اتصال نشانگرها به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه تنظیم شد. سپس محصولات حاصل از PCR بسته به نوع نشانگر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و یا پلی‌آکریلا-مید ۶ درصد تفکیک شدند و با استفاده از اتیدیوم‌بروماید رنگ‌آمیزی و توسط اشعه UV در دستگاه ژل‌داکیومنت مورد عکس‌برداری قرار گرفتند. نمره‌دهی آلل‌ها توسط مقایسه با مارکر وزنی و کنترل‌های مثبت و منفی به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) انجام شد.

برای تشخیص حضور آلل موثر *Yr*5 در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید از نشانگرهای مولکولی STS-7/STS-8 و STS-9/STS-10 استفاده شد. این نشانگرهای STS با جایگاه ژنی موردنظر دارای پیوستگی کامل بوده و حضور ژن را با تکثیر قطعه‌هایی به اندازه ۴۷۲bp و ۴۳۳bp نشان می‌دهند (Chen *et al*., 2003). برای بررسی حضور بلوک ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26 در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید از نشانگر مولکولی Iag95 استفاده شد. این نشانگر STS با جایگاه ژنی مورد نظر دارای پیوستگی کامل می‌باشد و حضور ژن را با تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۱۱۰۰bp نشان می‌دهد. نشانگرهای ژنتیکی مختلفی برای شناسایی ژن *Yr*15 وجود دارد که اکثر آنها آر،اف،ال،پی و میکروستلایت هستند. نقشه متراکمی از ناحیه کروموزمی ژن *Yr*15 توسط Peng *et al*. (2000) منتشر شد. بیش از هشت نشانگر میکروستلایت که با ژن *Yr*15 پیوستگی دارند برای شناسایی این مکان ژنی گزارش شده است، که این امر موجب توسعه نقشه پیوستگی ژن *Yr*15 می‌باشد (Peng *et al*., 2000). آزمون ژنتیکی حضور و یا عدم حضور آلل موثر *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 توسط دو نشانگر SNP به نام‌های caSNP4 و caSNP12 انجام شد. این دو نشانگر از جمله نزدیک ترین نشانگرها به جایگاه ژنی مورد نظر می‌باشند و دارای پیوستگی بالایی با آن هستند. در صورت وجود ژن مقاومت محصول PCR این دو نشانگر به ترتیب دارای قطعه‌ای با اندازه ۳۹۰bp و ۲۳۴bp می‌باشد و در صورت عدم وجود ژن هیچ قطعه‌ای در هر دو نشانگر تولید نمی‌شود (Dakori *et al*., 2010). به منظور شناسایی آلل موثر ژن‌های *Yr*27، *Yr*36 و *Yr*48 در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید به ترتیب از نشانگر-های مولکولی میکروستلایت (Xbarc7، Xbarc13، GPW1073، GPW320، Xgpw2225b، CFA2043، Xcfa2278، Xgpw1109)، میکروستلایت Xuhw 89 (با تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۱۲۲ bp) و نشانگر مولکولی SNF-A2 (با تکثیر

قطعه‌هایی به اندازه ۱۵۰bp~ و ۲۰۰bp~ نشان‌دهنده وجود و یا عدم وجود ژن *Yr*48 استفاده شد.

نتایج و بحث

در ارزیابی واکنش مرحله گیاه کامل از تعداد ۷۵ لاین مورد بررسی از جمعیت DH-26 نسبت به نژاد کرج (7E158A^{+},*Yr*27) تعداد ۲۲ لاین (۲۹/۳۳ درصد) مقاوم و ۵۳ لاین (۷۰/۶۶ درصد) حساس تشخیص داده شدند. در بررسی مقاومت مرحله گیاهچه‌ای، نسبت به نژاد کرج، تعداد ۵۲ لاین (۶۹/۳۳ درصد) دارای تیپ آلودگی حساس، ۹ لاین (۱۲ درصد) تیپ آلودگی نیمه‌مقاوم تا نیمه‌حساس و ۱۴ لاین (۱۸/۶۶ درصد) دارای تیپ مقاوم بودند. در بررسی مقاومت مرحله گیاهچه‌ای این جمعیت نسبت به نژاد کرمانشاه (110E158A+,Yr27)، تعداد ۵۳ لاین (۷۰/۶۶ درصد) دارای تیپ آلودگی حساس،۳ لاین (۴ درصد) تیپ آلودگی نیمه‌مقاوم تا نیمه‌حساس و ۱۹ لاین (۲۵/۳۳ درصد) دارای تیپ مقاوم بودند. در این جمعیت تعداد ۹ لاین در هر دو مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل نسبت به نژاد کرج واکنش مقاومت نشان دادند، که به احتمال زیاد دارای ژن‌های مقاومت از نوع گیاهچه‌ای هستند.

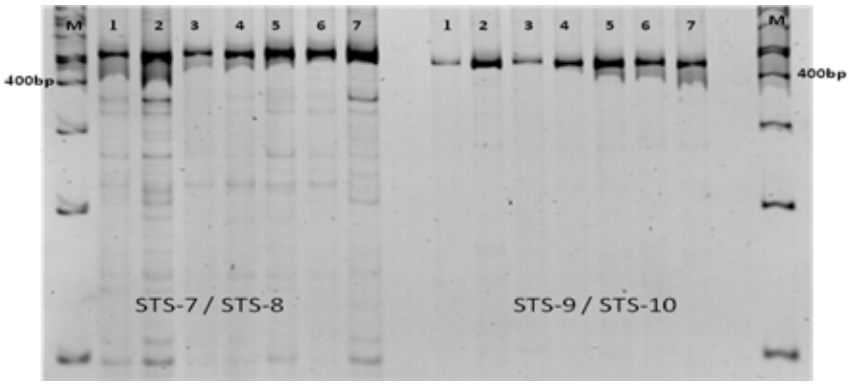
در بررسی مقاومت مرحله گیاه کامل در جمعیت DH-27 از تعداد ۴۵ لاین مورد بررسی ۳۴ لاین (۷۵/۵۵ درصد) مقاوم و ۱۱ لاین (۲۴/۴۴ درصد) حساس بودند. در ارزیابی مقاومت مرحله گیاهچه‌ای، نسبت به نژاد کرج، تعداد ۲۶ لاین (۵۷/۷۸ درصد) دارای تیپ آلودگی حساس، ۸ لاین (۱۷/۷۷ درصد) تیپ آلودگی نیمه‌مقاوم تا نیمه‌حساس و ۱۱ لاین (۲۴/۴۴ درصد) دارای تیپ مقاوم بودند. در بررسی مقاومت مرحله گیاهچه‌ای این جمعیت نسبت به نژاد کرمانشاه، تعداد ۳۲ لاین (۷۱/۱۱ درصد) دارای تیپ آلودگی حساس، ۶ لاین (۱۳/۳۳ درصد) تیپ آلودگی نیمه‌مقاوم تا نیمه‌حساس و ۷ لاین (۱۵/۵۵ درصد) دارای تیپ مقاوم بودند. در این جمعیت تعداد ۱۱ لاین در هر دو مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل نسبت به جدایه کرج واکنش مقاومت نشان دادند که به احتمال زیاد دارای ژن‌های مقاومت از نوع گیاهچه‌ای هستند.

همچنین در جمعیت DH-28 از تعداد ۳۰ لاین مورد بررسی در مرحله گیاه کامل ۲۱ لاین (۷۰ درصد) مقاوم و ۹ لاین (۳۰ درصد) حساس تشخیص داده شدند. در بررسی مقاومت مرحله گیاهچه‌ای، نسبت به نژاد کرج، تعداد ۱۵ لاین (۱۰درصد) دارای تیپ آلودگی حساس، ۵ لاین (۱۶/۶۶ درصد) تیپ آلودگی نیمه‌مقاوم تا نیمه‌حساس و۱۰ لاین (۳۳/۳۳ درصد) دارای تیپ مقاوم بودند. در ارزیابی مقاومت مرحله گیاهچه‌ای این جمعیت نسبت به نژاد کرمانشاه، تعداد ۲۵ لاین (۸۳/۳۳ درصد) دارای تیپ آلودگی حساس، ۱ لاین (۳/۳۳ درصد) تیپ آلودگی نیمه‌مقاوم تا نیمه‌حساس و ۴ لاین (۱۳/۳۳ درصد) دارای تیپ مقاوم بودند. در این جمعیت تعداد ۸ لاین در هر دو مرحله گیاهچه‌ای و گیاه کامل نسبت به جدایه کرج واکنش مقاومت نشان دادند که به احتمال زیاد دارای ژن‌های مقاومت از نوع گیاهچه‌ای هستند.

آزمون ژنتیکی جایگاه‌های ژنی *Yr*5، *Yr*15، *Yr*27 و *Yr*36

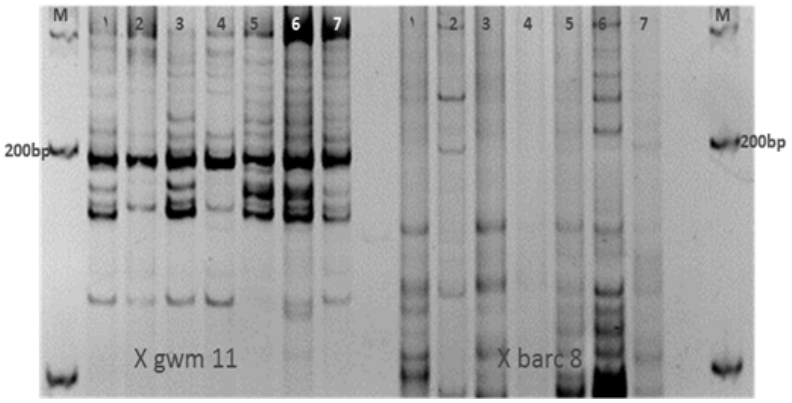
ژن *Yr*5 توسط Macer (1966) شناسایی و نامگذاری شد. این ژن روی بازوی بلند کروموزوم 2B و به فاصله ۲۱ سانتی‌مورگان از سانترومر قرار دارد و پیوستگی شدیدی با *Yr*7 دارد. منشاء این ژن گندم‌های *Triticum spelta album* بوده و تیپ آلودگی آن در مرحله گیاهچه 0 می‌باشد (Macer, 1966). با توجه به مشکل بودن تشخیص پلی‌مورفیسم با نشانگرهای این ژن و همچنین مشکلات استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید، چن و همکاران (در دست چاپ) استفاده از یک مرحله هضم با آنزیم برشی *Dpn*II را برای تشخیص بهتر پلی‌مورفیسم با استفاده از ژل آگارز ۲/۸ درصد پیشنهاد کرده‌اند. نتایج استفاده از نشانگرهای مولکولی STS-8 / STS-7 و STS-10 / STS-9 برای

بررسی حضور آلل موثر ژن *Yr*5 در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید در (شکل ۱) قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۱. ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد برای جایگاه ژنی Yr5 با نشانگرهای مولکولی STS-7/STS-8 و STS-9/STS-10 شامل: M- مارکر 100bp و شماره‌های ۱- قدس، ۲- MV17 ، ۳- هیبریدبرسی، ۴- فلاندرز، ۵-کنترل مثبت *Triticum spelta* var. *album*، ۶- کنترل مثبت *Yr*5/6*Avocet و ۷- بولانی.

محققانی چون Gerechter-Amitai and Stubbs (1970) گزارش کردند که ژنوتیپ شماره ۲۵ از *Triticum dicoccoides* به اکثر نژادهای زنگ زرد مناطق مختلف جغرافیایی مقاوم است. اخیراً مشخص شده است که این مقاومت به زنگ زرد به علت وجود ژن غالب *Yr*15 می‌باشد. این ژن بر روی بازوی کوتاه کروموزم 1B قرار دارد. ژن Yr15 در گونه‌های تتراپلویید و هگزاپلویید گندم وجود دارد (McIntosh and Silk 1996). با انجام آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای، بیماری‌زایی بر روی ژن *Yr*15 مشاهده نشد (Chen, 2005). برای تشخیص حضور آلل موثر *Yr*15 در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید از چهار نشانگر مولکولی ریزماهواره (میکروستلایت) Xgwm413 با فاصله cM ۴/۴، Xgwm273 با فاصله cM ۵/۷، Xgwm11 با فاصله cM ۶/۲ (با تکثیر قطعه‌ای به اندازه bp ۱۹۶) و Xbarc8 به فاصله cM ۹ استفاده شد (شکل۲).

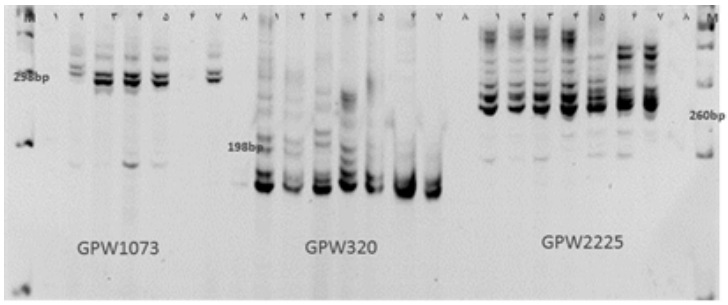


شکل ۲. ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد برای جایگاه ژنی *Yr*15 با نشانگرهای مولکولی Xgwm11 و Xbarc8 شامل: M مارکر 100bp شماره‌های ۱- قدس، ۲- MV17، ۳- هیبرید برسی، ۴- فلاندرز، ۵- A: 21-Yr15/6* Avocet 'S'، ۶- B: 31-Yr15/6* Avocet 'S' و ۷-بولانی.

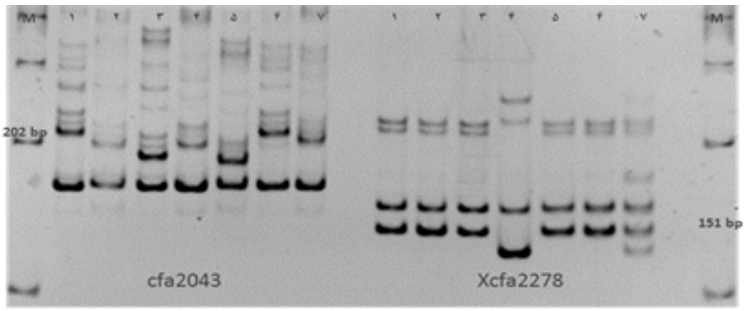
ژن مقاومت به زنگ زرد *Yr*27 در نزدیکی بازوی کوتاه کروموزم 2B گندم *Triticum aestivum* L. قرار دارد و مشخص شده است که دارای پیوستگی نزدیکی با ژن‌های مقاومت به بیماری زنگ قهوه‌ای

*Lr*13 و *Lr*23 می‌باشد. این ژن فاقد پیوستگی ژنتیکی با ژن *Lr*16 است. امتیاز دادن به واکنش ژن *Yr*27 در مرحله گیاهچه‌ای در جمعیت‌های در حال تفرق دشوار است. این ژن ظاهراً دارای مقاومت کاملی در شرایط مزرعه می‌باشد (McDonald *et al*., 2004). تا سال ۲۰۰۴ میلادی، بیش از ۳۲ ژن مقاومت به بیماری زنگ زرد به طور رسمی نامگذاری شده بود (Eriksen *et al*., 2004; McIntosh *et al*., 2003). ژن Yr27 که قبلاً به عنوان ژن سلکرک (Selkirk) و یا *Yr*Sk نامیده می‌شد (با شجره McMurachy/Exchange//3*Redman) در تعدادی از ارقام گندم توزیع شده توسط مرکز بین‌المللی تحقیقات ذرت و گندم (CIMMYT) شامل (Buckbuck =Ciano 79), (Crow, Bluejay = Nacozari 76), (Tesia 79, Opata 85, Kauz = Bacanora 88, Bakhtawar, WH542, Atrak, Memof), (Attila=PBW343, MH97, Kubsa, Shirudi) Chamran, وجود دارد (Wellings, 1992). با توجه به اینکه مقاومت اکثر ارقام گندم تحت کشت در کشورهای ایران، سوریه، پاکستان و هندوستان به طور گسترده بر اساس ژن *Yr*27 می‌باشد و برخی از نژادهای جدید زنگ زرد در این ناحیه نسبت به ژن *Yr*27 بیماری‌زا هستند این مقاومت بسیار آسیب‌پذیر است (McDonald *et al.,* 2004).

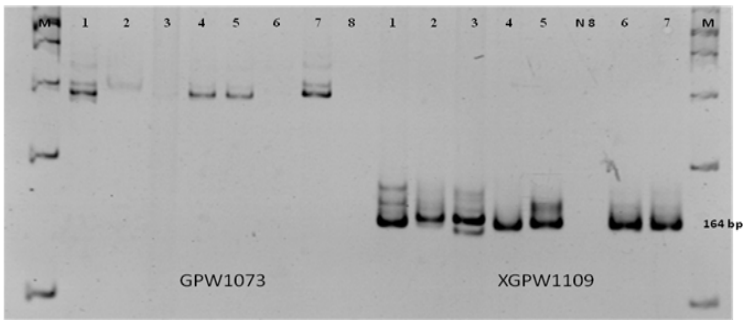
نتایج استفاده از نشانگرهای مولکولی مورد استفاده برای بررسی حضور آلل موثر ژن *Yr*27 در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید در (شکل‌های ۳ تا ۶) قابل مشاهده می‌باشد.



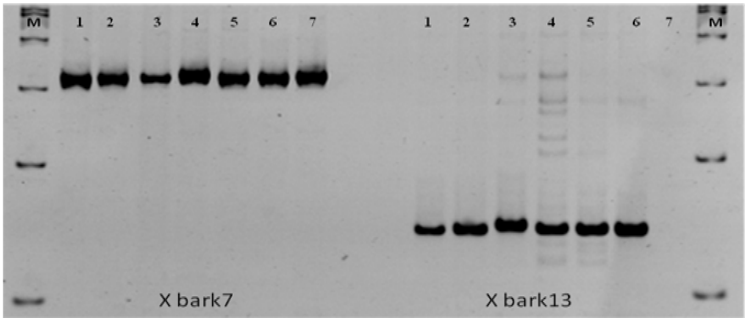
شکل ۳. ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد برای جایگاه ژنی *Yr*27 با نشانگرهای مولکولی GPW1073، GPW320 و GPW2225 شامل: M– مارکر 100bp و شماره‌های ۱– قدس، ۲– MV17، ۳– هیبرید برسی، ۴– فلاندرز، ۵– بولانی، ۶– کنترل مثبت Selkirk،۷– کنترل مثبت Yr27/6* Avocet 'S'، ۸– کنترل منفی



شکل ۴. ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد برای جایگاه ژنی *Yr*27 با نشانگرهای مولکولی cfa2043 و Xcfa2278 شامل: M– مارکر 100bp و شماره‌های ۱– قدس، ۲– MV17، ۳– هیبرید برسی، ۴– فلاندرز، ۵– بولانی، ۶– کنترل مثبت Selkirk، ۷– کنترل مثبت Yr27/6* Avocet 'S'، ۸– کنترل منفی.



شکل ۵. ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد برای جایگاه ژنی Yr27 با نشانگرهای مولکولی GPW1073 و XGPW1109 شامل: M- مارکر 100bp و شماره‌های ۱- قدس، ۲- MV17، ۳- هیبرید برسی، ۴- فلاندرز، ۵- بولانی، ۶- کنترل مثبت Selkirk، ۷- کنترل مثبت Yr27/6* Avocet 'S'، ۸- کنترل منفی.



شکل ۶. ژل پلی‌اکریل‌آمید ۶ درصد برای جایگاه ژنی *Yr*27 با نشانگرهای مولکولی Xbark7 و Xbark13 شامل: M- مارکر 100bp و شماره‌های ۱- قدس، ۲- MV17، ۳- هیبرید برسی، ۴- فلاندرز، ۵- بولانی، ۶- کنترل مثبت Selkirk، ۷- کنترل مثبت Yr27/6* Avocet 'S'، ۸- کنترل منفی

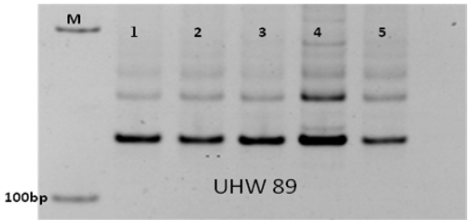
ژن‌های مقاومت غیراختصاصی در مراحل انتهایی رشد گیاه بیان می‌شوند و دامنه وسیعی از مقاومت را در برابر پاتوژن به وجود می‌آورند. این ژن‌ها نسبت به مقاومت مرحله گیاهچه‌ای پایداری بیشتری دارند. یک گروه خاص از ژن‌های مقاومت مرحله گیاه کامل ژن‌های مقاومت گیاه کامل دما بالا[1] (HTAP) هستند که پس از گسترش بیماری، زمانی که متوسط دمای شب بالاتر از ۱۰ درجه سانتی‌گراد و دمای روز بین ۳۰ - ۲۵ درجه سانتی‌گراد باشد موثر خواهند شد (Line and Chen, 1995; Milus and Line, 1986a; Qayoum and Line, 1985). سطح این نوع از مقاومت اغلب متوسط بوده و تحت تاثیر مرحله رشد گیاه، دما و رطوبت محیط می‌باشد. ژن *Yr*36 نیز از این نوع بوده که دارای پیوستگی نزدیکی با جایگاه ژنی میزان پروتئین بذر Gpc[2] می‌باشد. این ژن ابتدا از *Triticum turgidum* ssp. *Dicoccoides* به گندم دوروم منتقل شد. نتایج تحقیقات اولیه نشان داد که وجود این ژن در زمینه ژنتیکی گندم‌های دوروم موجب اثرات کمی در میزان افزایش محصول دانه، کیفیت پروتئین، ارتفاع گیاه و ظهور سنبله می‌شود. این ژن جدید مقاومت به بیماری زنگ زرد به عنوان *Yr*36 تعیین شد (McIntosh *et al*., 2005). آزمایشات تهیه نقشه‌های ژنتیکی نشان داد که جایگاه QTL منتقل شده برای این ژن در گندم دوروم و گندم نان بر روی بازوی کوتاه

1. High temperature adult-plant resistance genes

2. Grain protein content

کروموزم 6B قرار دارد، برای انجام تحقیقات به‌نژادی دو گروه از نشانگرهای مولکولی شامل آر ا ف ال پی و میکروستلایت برای جایگاه ژنی Gpc-B1 یا Yr36 وجود دارد. نشانگرXuhw89 در فاصله نزدیکی (۰/۱cM) از ژن Gpc-B1 قرار دارد. و در bp ۴ پایین تر از ژن Gpc-B1 با اندازه bp ۱۲۲ آشکار می‌شود. این نشانگر در اکثر گندم‌های دوروم وجود ندارد (Distelfeld *et al*., 2006).

نتیجه استفاده از نشانگر مولکولی UHW89 برای بررسی حضور آلل موثر ژن *Yr*36 در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید در (شکل ۷) قابل مشاهده می‌باشد.



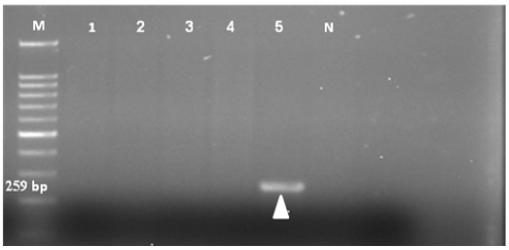
شکل ۷. ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶ درصد برای جایگاه ژنی *Yr*36 با نشانگر مولکولی UHW89 شامل: M- مارکر 100bp و شماره‌های ۱- قدس، ۲- MV17، ۳- هیبرید برسی، ۴- فلاندرز و ۵ – بولانی.

بررسی انجام شده در این تحقیق نشان داد که نشانگرهای استفاده شده برای جایگاه‌های ژنی *Yr*5،*Yr*15، *Yr*27 و *Yr*36 قادر به تشخیص تفاوت بین والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید، کنترل حساس (بولانی) و کنترل‌های مثبت این مکان‌های ژنی نبودند. در نتیجه پیشنهاد می‌شود که برای بررسی این جایگاه‌های ژنی از نشانگرهای با دقت بالاتر استفاده شود.

آزمون ژنتیکی جایگاه‌های ژنی *Sr*38/*Yr*17/*Lr*37 و *Yr*48

جایگاه ژنی *Sr*38/*Yr*17/*Lr*37 اولین بار با انتقال یک قطعه کروموزومی به اندازه ۳۸- ۲۵ سانتی‌مورگان از ژنوم 2N *T. ventricosum* به ژنوم 2A در *T.aestivum* واریته VPM1 و سپس به واریته‌های مدسن[1] و تاچر[2] منتقل شد (Seah *et al*., 2000; McIntosh *et al*., 1995). تحقیقات بعدی نشان داد که ژن *Lr*37 با توجه به ژنوتیپ گیرنده واکنش‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهد و مقاومت ژن‌های *Lr*37 و *Yr*17 نیز شکسته شده است. با این وجود این جایگاه ژنی دارای مقاومت بالایی نسبت به تعداد زیادی از جدایه‌های بیماری زنگ در مرحله گیاهچه‌ای است و می‌تواند در برنامه‌های اصلاح گندم مورد استفاده قرار بگیرد (Helguera *et al*., 2003).

جهت بررسی جایگاه ژنی *Sr*38/*Yr*17/*Lr*37 در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید از نشانگر مولکولی VENTRIUP-Ln2 استفاده شد (شکل ۸).



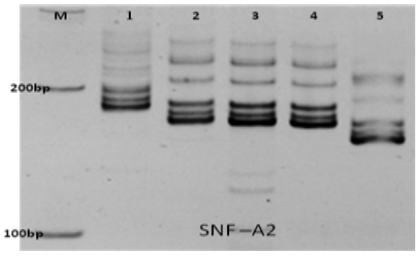
شکل ۸. ژل آگارز ۱/۵ درصد برای جایگاه ژنی *Sr*38/*Yr*17/*Lr*37 با نشانگر مولکولی VENTRIUP-Ln2 شامل: M- مارکر 100bp و شماره‌های ۱- قدس، ۲- MV17، ۳- هیبرید برسی، ۴- فلاندرز، ۵- (کنترل مثبت)، N- کنترل منفی. شماره ۵ با داشتن قطعه bp ۲۵۹ حاوی جایگاه ژنی *Sr*38/*Yr*17/*Lr*37 بود.

در تحقیقات انجام شده بر روی ارقام و لاین‌های در دست معرفی بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر با استفاده از نشانگر فوق وجود این جایگاه ژنی تنها در لاین در دست معرفی M-90-9 با تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۲۵۹bp مورد تایید قرار گرفت (Mehrabi *et al*., 2015). در تحقیقات انجام شده بر روی ۱۸۶ لاین اینبرد

1. Madsen
2. Thatcher

نوترکیب[1] (RILs) حاصل از تلاقی UC1110 و PI610750 منبع جدیدی از مقاومت جزئی به زنگ زرد مشخص شد که *Yr*48 نامیده می‌شود. ژن *Yr*48 در یک ناحیه ۵/۳ cM از انتهای بازوی بلند کروموزوم 5A قرار دارد. در تحقیقات مزرعه‌ای انجام شده در طی چهار فصل زراعی اثر ژن *Yr*48 بر روی مجموع تغییرات شدت بیماری و کاهش بیماری در مقایسه با لاین‌های کاملاً حساس به ترتیب ۱۰ و ۶۳ درصد محاسبه شد (Lowe *et al*., 2011).

نزدیک ترین نشانگرهای پیوسته به این ژن که برای برنامه‌های به‌نژادی انتخاب به کمک نشانگر مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از نشانگرهای *SNF*-A2 با فاصله ۰/۱۸ cM از ژن Yr48، BE495011 با فاصله ۰/۰۹ cM از ژن Yr48 و cfa149 با فاصله ۰/۰۶ cM از ژن *Yr*48. نتیجه استفاده از نشانگر مولکولی مورد استفاده برای بررسی حضور آلل موثر ژن *Yr*48 در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید در (شکل ۹) قابل مشاهده می‌باشد.



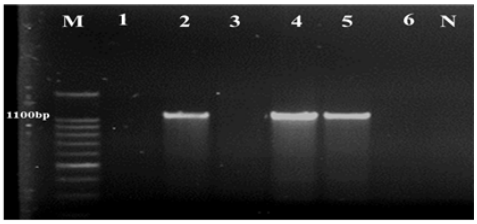
شکل ۹. ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶ درصد برای جایگاه ژنی *Yr*48 با نشانگر مولکولی SNF-A2 شامل: M- مارکر 100bp و شماره‌های ۱- قدس، ۲- MV17، ۳- هیبرید برسی، ۴- فلاندرز و ۵- بولانی.

عدم تکثیر باندهای مورد نظر در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید توسط نشانگرهای مورد بررسی در آزمون ژنتیکی حضور و یا عدم حضور آلل‌های موثر جایگاه‌های ژنی *Sr*38/*Yr*17/*Lr*37 و *Yr*48 بیان‌کننده عدم حضور آلل موثر این مکان‌های ژنی در والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید بود.

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26

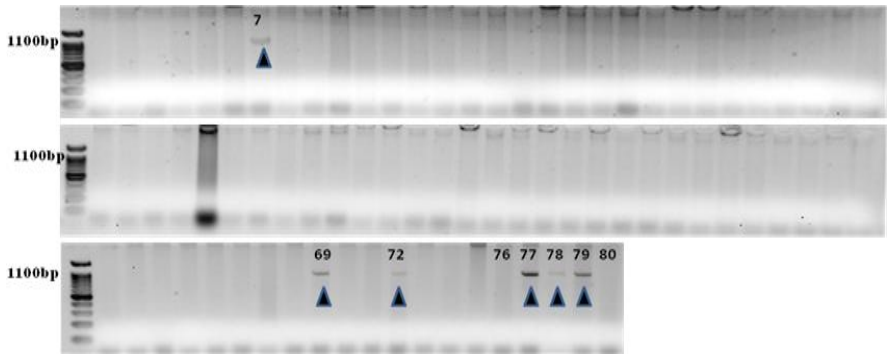
ژن *Sr*31 مقاومت مرحله گیاهچه‌ای را به صورت اختصاصی بروز می‌دهد و دارای پیوستگی با ژن‌های مقاومت در برابر زنگ زرد *Yr*9 و زنگ قهوه‌ای *Lr*26 می‌باشد. این ژن به همراه ژن‌های *Lr*26 و *Yr*9 در یک جایگاه ژنی قرار دارد. این جایگاه ژنی بر روی کروموزوم 1BL قرار داشته و به واسطه یک جابجایی کروموزومی از کروموزوم 1RS چاودار منشاء گرفته است (McIntosh *et al*., 1995). بررسی انجام شده بر روی والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید در این تحقیق نشان داد که ارقام MV17 و فلاندرز دارای جایگاه ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26 بودند (شکل ۱۰).

به منظور تشخیص حضور بلوک ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26 در لاین‌های دابل‌هاپلویید، دو جمعیت DH-26 و DH-27 با استفاده از نشانگر مولکولی Iag95 مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج بررسی انجام شده نشان داد که به جز رقم MV17 (۷۷) و دو کنترل مثبت (۷۸ و ۷۹) تنها سه لاین دابل‌هاپلویید با شماره‌های ۷، ۶۹ و ۷۲ حاصل از جمعیت DH-26 دارای بلوک ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26 بودند (شکل‌های ۱۱ و ۱۲).

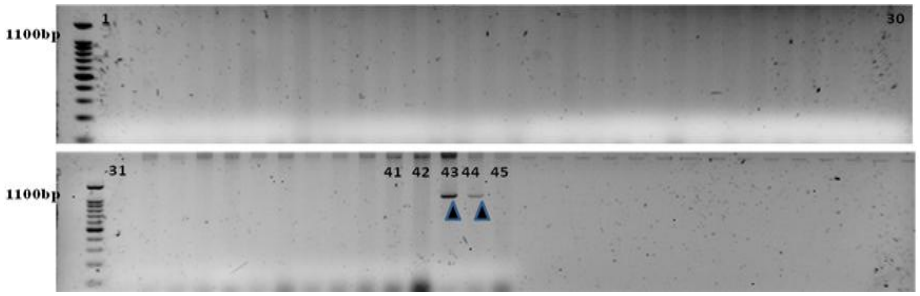


شکل ۱۰. ژل آگارز ۱/۵ درصد برای جایگاه ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26 با نشانگر مولکولی Iag95 شامل: M- مارکر 100bp و شماره‌های ۱- قدس، ۲- MV17، ۳- هیبریدبرسی، ۴- فلاندرز، ۵- کنترل مثبت Sr31/6*LMPG، ۶- بولانی، N- کنترل منفی. شماره‌های ۲،۴ و۵ با داشتن قطعه ۱۱۰bp حاوی جایگاه ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26 بودند.

1. Recombinant inbred lines



شکل ۱۱. ژل آگارز ۱/۵ درصد برای جایگاه ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26 با نشانگر مولکولی Iag95 شامل: M مارکر 100bp شماره‌های ۷۵–۱ لاین‌های مورد بررسی از جمعیت DH-26 شماره ۷۶– قدس، ۷۷–MV17، ۷۸– کنترل مثبت،۷۹– کنترل مثبت،۸۰– کنترل منفی



شکل ۱۲- ژل آگارز ۱/۵ درصد برای جایگاه ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26 با نشانگر مولکولی Iag95 شامل: M مارکر 100bp شماره‌های ۴۱–۱ لاین‌های مورد بررسی از جمعیت DH-27 شماره۴۲– قدس،۴۳–فلاندرز، ۴۴– کنترل مثبت و ۴۵– کنترل منفی.

نتایج آزمون لاین‌های دابل‌هاپلویید نسبت به بیماری‌های زنگ‌زرد و زنگ‌سیاه نشان داد که لاین‌های شماره ۷، ۶۹ و ۷۲ نسبت به بیماری زنگ‌زرد حساس ولی نسبت به بیماری زنگ‌سیاه مقاوم می‌باشند (جدول۱).

علی‌رغم انتقال بلوک ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26 به سه لاین دابل‌هاپلویید DH-26-7، DH-26-86 و DH-26-91، این لاین‌ها نسبت به نژادهای بیماری زنگ زرد 7E158A^{+},*Yr*27 و 110E158A^{+}, *Yr*27 واکنش حساسیت نشان دادند. همچنین با توجه به نتایج آزمون بیماری‌زایی/غیربیماری‌زایی پاتوتیپ‌های (نژاد) *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* عامل زنگ زرد در گلخانه، شکسته شدن مقاومت ژن *Yr*9 نسبت به نژادهای فوق مورد تایید قرار گرفت.

در خصوص مقاومت به بیماری زنگ سیاه با توجه به شکسته شدن مقاومت ژن *Sr*31 توسط نژاد TTKSK وجود مقاومت نسبی مرحله گیاهچه‌ای در دو لاین دابل‌هاپلویید DH-26-7 و DH-26-86 می‌تواند به علت وجود سایر ژن‌های مقاومت به زنگ سیاه در این لاین‌ها باشد.

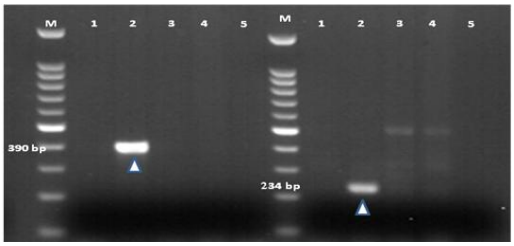
جدول ۱. واکنش لاین‌های دارای بلوک ژنی *Sr*31/*Yr*9/*Lr*26 نسبت به نژادهای عامل بیماری زنگ زرد و سیاه

شماره	کد شناسایی	Yr			Sr		
		7E158A^{+},*Yr*27		110E158A^{+},*Yr*27	TTSTK		TTKSK
		APR	Seedling	Seedling	APR	Seedling	Seedling
7	DH-26-7	60 MS	7	7	20R	2C	2
69	DH-26-86	100 S	7	7	40S	;2	2^{+}
72	DH-26-91	40 M	0C	7	0	3^{+}	4

آزمون ژنتیکی جایگاه ژنی *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38

جایگاه ژنی *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 برای اولین بار با استفاده از تجزیه QTL بر روی بازوی کوتاه کروموزوم 7D مکان‌یابی شد(Dyck, 1987). این جایگاه ژنی دارای ژن *Yr*18، مقاومت به زنگ زرد، ژن *Pm*38، مقاومت به سفیدک پودری و ژن *Lr*34 مقاومت به زنگ قهوه‌ای می‌باشد (Singh, 1992b; Spielmeyer *et al*., 2005). این بلوک ژنی دارای ژن‌های مقاومت مرحله گیاه کامل است و مقاومت غیر اختصاصی و با دوامی را در گیاه ایجاد می‌کند (Krattinger *et al*., 2009). آزمون ژنتیکی حضور و یا عدم حضور آلل موثر *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 بر روی والدین لاین‌های دابل‌هاپلویید توسط نشانگرهای caSNP4 و caSNP12 نشان داد که تکثیر قطعه‌های bp ۳۹۰ و bp ۲۳۴ تنها بیان‌کننده حضور آلل موثر این بلوک ژنی در والد MV17 بود (شکل ۱۳).

در بررسی این جایگاه ژنی در ارقام و لاین‌های گندم نان با نشانگر csLV34 مشخص شد که ارقام و لاین‌های ونگشوبای[1]، WS-86-14، اینیا، کاوه، اترک،MV-17، ارگ، بم، نیک نژاد،MS-85-17 و نیشابور دارای بلوک ژنی مقاومت گیاه کامل *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 می‌باشند (Mohammadi *et al*., 2013). همچنین در تحقیقات انجام شده با استفاده از نشانگرهای فوق وجود این جایگاه ژنی در لاین‌های در دست معرفی بخش غلات موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر شامل MS-87-9، MS-87-8، WS-89-6 و DW-81-18 مورد تایید قرار گرفت (Mehrabi *et al*., 2015).



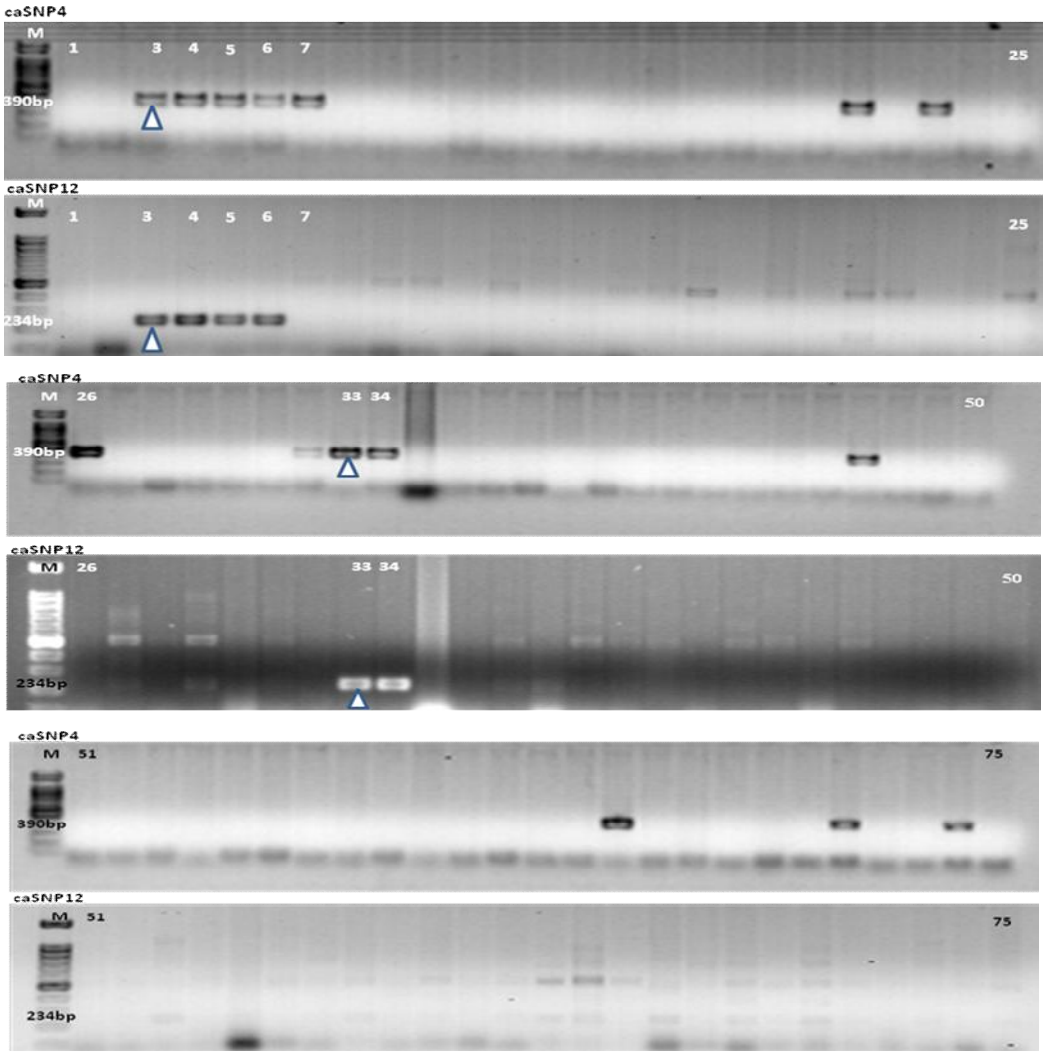
شکل ۱۳. ژل آگارز ۱/۵ درصد برای جایگاه ژنی *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 با نشانگرهای مولکولی caSNP4 و caSNP12 شامل: M- مارکر 100bp و شماره‌های ۱- قدس، ۲- MV17، ۳- هیبریدبرسی، ۴- فلاندرز و ۵ – بولانی. شماره ۲ با داشتن قطعه‌های bp ۳۹۰ و bp ۲۳۴ حاوی جایگاه ژنی *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 بود.

علی‌رغم انتقال بلوک ژنی *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 به شش لاین دابل‌هاپلویید DH-26-3، DH-26-4، DH-26-5، DH-26-6، DH-26-33 و DH-26-34 این لاین‌ها نسبت به نژادهای بیماری زنگ زرد 7E158A^{+},*Yr*27 و 110E158A^{+},*Yr*27 واکنش حساسیت نشان دادند (جدول ۲). با توجه به نتایج آزمون بیماریزایی/ غیربیماریزایی پاتوتیپ‌های (نژاد) *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici* عامل زنگ زرد در گلخانه و نتایج آزمایش لاین‌های دابل‌هاپلویید در مزرعه، شکسته شدن مقاومت ژن *Yr*18 نسبت به نژادهای 7E158A^{+},*Yr*27 و 110E158A^{+},*Yr*27 مورد تایید قرار گرفت.

جدول ۲. واکنش لاین‌های دارای بلوک ژنی *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 نسبت به جدایه‌های عامل بیماری زنگ زرد

شماره	کد شناسایی	Yr		
		7E158A^{+},*Yr*27		110E158A^{+},*Yr*27
		APR	Seedling	Seedling
3	DH-26-3	80 S	5	7
4	DH-26-4	90 S	7	7
5	DH-26-5	90 S	7	7
6	DH-26-6	10 MR	0;CN	7
33	DH-26-33	90 S	7	7
34	DH-26-34	30 M	3P0-3P7	4P0-2P5

1. Wangshubai



شکل ۱۴- ژل آگارز ۱/۵ درصد برای جایگاه ژنی *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 با نشانگرهای مولکولی caSNP4 وcaSNP12 شامل: M– مارکر 100bp و لاین‌های دابل‌هاپلویید جمعیت DH-26 از شماره ۷۵–۱ . لاین‌های شماره ۳، ۴، ۵، ۶، ۳۳ و۳۴ با داشتن قطعه‌های bp ۳۹۰ و bp ۲۳۴ حاوی جایگاه ژنی *Lr*34/*Yr*18/*Pm*38 بودند.

در یک جمعیت اصلاحی حاصل از دابل‌هاپلوییدی و یا نسل‌های پیشرفته، برای صفاتی که با یک ژن کنترل می‌شوند یک نسبت نزدیک به ۱:۱ از لاین‌های مقاوم تا حساس مورد انتظار می‌باشد. اما در برخی از موارد مشاهده این نسبت امکان پذیر نیست. این پدیده با عنوان انتقال ترجیحی یک قطعه از کروموزوم مورد بررسی قرار گرفته است، به طوری که Bariana *et al.* (2001)، Nyquist (1962) وTsilo and Anderson (2008) همگی انتقال ترجیحی قطعه‌ای از کروموزوم 2BS را که شامل ژن Sr36 بود گزارش کردند در مقایسه Wu *et al.* (2009) انتقال قطعه‌ای ازکروموزوم 2BS را که شامل ژن *Sr*40 بود گزارش کردند، که به صورت ترجیحی منتقل نشده بود.

باتوجه به کم بودن تعداد لاین‌های دابل‌هاپلویید دارای مکان‌های ژنی مورد انتظار در این تحقیق، می‌توان این پدیده را ناشی از انتقال ترجیحی قطعات کروموزمی حامل مکان‌های ژنی مورد بررسی و یا استفاده از نسل سوم بک‌کراس جهت تولید جمعیت لاین‌های دابل‌هاپلویید دانست که با توجه به نتایج بدست آمده مورد اخیر در تولید لاین‌های دابل‌هاپلویید

مقاوم نسبت به بیماری زنگ سیاه ساقه گندم در مرحله گیاه کامل با تولید ۲۳ گیاه مقاوم (۶۷/۶۶ درصد) نسبت به ۷ گیاه حساس (۲۳/۳۳ درصد) در جمعیت DH-28 مفید بوده است.

سپاسگزاری

از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به خاطر فراهم نمودن امکان این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Alexopoulos CJ, Mims CW (1997) Introductory mycology, third ed. pp.632.

Bakhtiar F, Bozorgipour R, Shahabi S (2006) Production of doubled haploid lines of wheat using detached tillering method in cross between wheat and maize, and evaluation of some agronomic characters. Seed and Plant .22-3:351-367. (in Persian)

Bariana HS, Hayden MJ, Ahmed NU, Bell JA, Sharp PJ, McIntosh RA (2001) Mapping of durable adult plant and seedling resistances to stripe rust and stem rust diseases in wheat. Aust. J. Agric. Res. 52:1247–1255.

Basnet BR, Singh S, Lopez-Vera EE, Huerta-Espino J, Bhavani S, Jin Y, Rouse MN, Singh RP (2015) Molecular mapping and validation of SrND643: A new wheat gene for resistance to stem rust pathogen Ug99 race group. Phytopathology 105:470-476.

Chen XM, Soria MA, Yan GP, Sun J, Dubcovsky J (2003) Development of Sequence Tagged Site and Cleaved Amplified Polymorphic Sequence Markers for Wheat Stripe Rust Resistance Gene *Yr5*. In: Crop Science 43: 2058-2064.

Chen XM (2005) Epidemiology and control of strip rust (*Puccinia striiformis* f.sp.*tritici*) on wheat. Canadian Journal of Plant pathology 27: 314 – 337.

Dakori A, Brent D, Callum M, Andrzej Z, Cloutier S (2010) Fine-mapping of the leaf rust *Lr34* locus in *triticum aestivum* L. and characterization of large germplasm collections support the ABC transporter as essential for gene function. Theor. Appl. Genet. 121: 373-384

Distelfeld A, Uauy C, Fahima T, Dubcovsky J (2006) Physical map of the wheat high-grain protein content gene *Gpc-B1* and development of a high-throughput molecular marker. In: New Phytologist, 169:753-763

Dyck PL (1987) The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. Genome 29: 467-469.

Eriksen L, Afshari F, Christiansen MJ, McIntosh RA, Jahoor A, Wellings CR, (2004) *Yr32* for resistance to stripe (yellow) rust present in wheat cultivar Carstens V. Theor Appl Genet 108: 567-575.

Gerechter-Amitai ZK, Stubbs RW (1970) A valuable source of yellow rust resistance in Israeli populations of wild emmer, *Triticum dicoccoides* Koern. Euphytica 19: 12-21.

Gupta Varshney RK, Roy JK, Prasad M (1999a) Development of molecular markers for wheat breeding at Meerut, a center of wheat biotechnology network in India. Annu.wheat News, in press, 1-45.

Helguera M, Khan IA, Kolmer J, Lijavetzky D, Zhang-qi L, Dubcovsky J (2003) PCR assay for the *Lr37- Yr17- Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. Crop Sci. 43: 1839-1847.

Johnson R (1981) Durable resistance definition of genetic control, and attainment in plant breeding. Phytopathology. 71(8): 567-568.

Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeyer W, Singh RP (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. Science 323: 1360–1363.

Line RF, Chen XM (1995) Successes in breeding for and managing durable resistance to wheat rusts. Plant Dis 79: 1254–1255

Lowe I, Jankuloski L, Chao SM, Chen XM, See D, Dubcovsky J (2011) Mapping and validation of QTL which confer partial resistance to broadly virulent post-2000 North American races of stripe rust in hexaploid wheat. In: Theoretical and Applied Genetics, 123:143-157.

Macer RCF (1966) The formal and monosomic genetic analysis of strip rust *puccinia striformis* resistance in wheat. In Maker, J. (ed). Proceeding of the Second International Wheat Genetic Symposium. Lund, Sweden 1963, Hereditas Supplement. 2: 127-142.

McDonald DB, McIntosh RA, Wellings CR, Singh RP, Nelson JC (2004) Cytogenetical studies in wheat XIX. Location and linkage studies on gene *Yr27* for resistance to stripe (yellow) rust. Euphytica 136: 239-248.

McIntosh RA, Hart GE, Devos KM, Gale MD (1995) Catalogue of gene symbols for wheal: 1995 supplement. Wheat Information Service 81:22-49.

McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. CSIRO East Melbourne, Australia.

McIntosh RA, Silk J (1996) Cytogenetic studies in wheat XVII. Monosomic analysis and linkage relationships of gene *Yr15* for resistance to stripe rust: Euphytica, 89(3): 395-399.

McIntosh RA, Yamazaki Y, Devos KM, Dubcovsky J, Rogers WJ, Appels R (2003) Catalogue of gene symbols for wheat. In: Proc. 10th Int Wheat Genet Symp, Vol. 4. Instituto Sperimen-tale per la Cerealicoltura, Rome, Italy.

McIntosh RA, Devos KM, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris CF, Appels R, Anderson OA (2005) Catalogue of gene symbols for wheat: 2005 supplement http://wheat.pw.usda.gov

McNeal FH, Konzak CF, Smith EP, Tate WS, Russell TS (1971) 'A Uniform System for Recording and Processing Cereal Research Data.' Agricultural Research Service Bulletin 34-121. (United States Department of Agriculture: Washington.)

Mehrabi R, Sarhangi M, Ala-hassani E, Ghazvini H, Afshari F (2015) Study on present of resistance gene Loic to yellow, Stem and leaf rust diseases using molecular marker in pre-released wheat lines. Crop Biotech.7: 49-58.

Milus EA, Line RF (1986a) Number of genes controlling high temperature adult-plant resistance to stripe rust in wheat. Phytopathology. 76: 93-96.

Mohammadi M, Torkamaneh D, Patpour M (2013) Seedling stage resistance of Iranian bread wheat germplasm to race Ug99 of *puccinia graminis* f.sp. *tritici*. Plant Dis. 97: 387-392.

Nyquist NE (1962) Differential fertilization in the inheritance of stem rust resistance in hybrids involving a common wheat strain derived from *Triticumtimopheevii*. Genetics 47:1109-1124.

Peng JH, Fahima T, Roeder MS, Huang QY, Dahan A, Li YC, Grama A, Nevo E (2000) High-density molecular map of chromosome region harboring stripe-rust resistance genes *YrH52* and *Yr15* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. In: Genetica, 109(3): 199-210.

Peterson RF, Campbell AB, Hannah AE (1948) A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stems of cereals. Canadian Journal of Research Section C. 26: 496-500.

Qayoum A, Line RF (1985) High-temperature, adult-plant resistance to stripe rust of wheat. Phytopathology 75: 1121-1125

Roelfs AP (1978) Estimated losses caused by rust in small grain cereal in the United States during 1918-1976. Miscellaneous publication 1363. (United States Department of Agriculture; Washington DC.)

Roelfs AP, Singh RP, Saari EE (1992) Rust disease of wheat: concepts and method of disease management. Mexico, D.F.: CIMMYT. pp: 81.

Saari EE, Prescott JM (1985) World distribution in relation to economic loss. pp. 259–289, *in:* Roelfs AP, Bushnell WR (editors). The cereal rusts. Vol. 2: Diseases, distribution, epidemiology and control. Academic Press, Orlando, FL, USA.

Saghai-maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 8014-8019.

Seah S, Spielermeyer W, Jahier J, Sivasithamparam K, Lagudah ES (2000) Resistance gene analogs within an introgressed chromosomal segment derived from *Triticum ventricosum* that confers resistance to nematode and rust

pathogens in wheat. Mol. Plant-microbe Interact. 13: 344-341.

Singh RP (1992b) Genetic association between gene Lr34 for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in bread wheats. Crop Sci. 32: 874-878.

Singh RP (2004) Genetics and breeding for durable resistance to leaf and strip rusts in wheat.pp.213.

Snape JW (1989) Doubled haploid breeding, theoretical basis and practical applications. In Mujeeb-Kazi A,. and Sitch LA (Eds). Review of Advances in plant Biotechnology, 1985-88, pp: 19-30. International Maize and Wheat Improvement Center, Mexico/ International Rice Research Institute, P. o. Box 933, Manila, Philippines.

Spielmeyer W, Macintosh RA, Kolmer J, Lagudah ES (2005) Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust co-segregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. Theor. Appl. Genet. 11: 731-735.

Torabi M, Mardoukhi V, Nazari K, Afshari F, Forootan AR, Rami MA, Golzar H Kashani AS (1995) Effectiveness of wheat yellow rust resistance genes in different parts of Iran. Cereal Rust and Powdery Mildow Bulletin. 23: 9-12.

Tsilo TJ, Jin Y, Anderson JA (2008) Diagnostic microsatellite markers for thedetection of stem rust resistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat. Crop Sci. 48: 253-261.

Wellings CR (1992) Resistance to stripe (yellow) rust in selected spring wheats. Vortr¨age fur Pflanzenz¨uchtung 24: 273-275.

Wu S, Pumphrey M, Bai G (2009) Molecular mapping of stem rust-resistance gene *Sr40* in wheat. Crop Sci. 49: 1682-1686.